

BEST AVAILABLE COPY

(13)

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-073499

(43)Date of publication of application : 19.03.1996

(51)Int.Cl.

C07K 14/79

A61K 38/16

A61K 38/00

C07K 7/08

C12P 21/06

(21)Application number : 06-232026

(71)Applicant : SNOW BRAND MILK PROD CO LTD

(22)Date of filing : 01.09.1994

(72)Inventor : KAWASAKI ISAHIRO
DOSEMARI SHUNICHI
SHIMIZU KEIKO
KOGA YASUHIRO

(54) NEW PEPTIDE AND IMMUNOPOTENTIATOR

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a new peptide, available from an enzymolytic product by carrying out the enzymolysis of lactoferrins with a protease, having a specific amino acid sequence, capable of manifesting the immunopotentiating and cytomegalovirus phylactic activities and useful for an immunopotentiator, etc.

CONSTITUTION: This new peptide comprises a peptide containing an amino acid sequence represented by formula I, a peptide deficient in 1-3 amino acid residues at the N-terminal of the peptide represented by formula I and a peptide, etc., containing an amino acid sequence represented by formula II (S-S bond may be SH groups in a reduced state). The peptide has mitogen activities and is capable of manifesting immunopotentiating and cytomegalovirus phylactic activities and is useful as a medicine such as an immunopotentiator. The peptide is obtained by carrying out the enzymolysis of a human lactoferrin with a protease such as pepsin, treating the resultant enzymolytic product by high-performance liquid chromatography and fractionating the product.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 31.05.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3506274

[Date of registration] 26.12.2003
[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]
[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]
[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-73499

(43) 公開日 平成8年(1996)3月19日

| | | | | |
|---------------------------|------|---------|-----------------|--------------------|
| (51) Int.Cl. ⁸ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
| C 0 7 K 14/79 | | 8318-4H | | |
| A 6 1 K 38/16 | ADY | | | |
| 38/00 | ABD | | | |
| | | | A 6 1 K 37/ 14 | ADY |
| | | | 37/ 18 | ABD |
| | | | 審査請求 未請求 請求項の数9 | FD (全 11 頁) 最終頁に続く |

(21) 出願番号 特願平6-232026

(22) 出願日 平成6年(1994)9月1日

(71) 出願人 000006699

雪印乳業株式会社

北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

(72) 発明者 川崎 功博

埼玉県川越市笠幡4881-21

(72) 発明者 堂迫 俊一

埼玉県浦和市北浦和5-15-39-616

(72) 発明者 志水 恵子

神奈川県海老名市さつき町1-15-203

(72) 発明者 古賀 泰裕

神奈川県伊勢原市上粕屋246 東海大学職員住宅307

(74) 代理人 弁理士 藤野 清也 (外1名)

(54) 【発明の名称】 新規ペプチドおよび免疫賦活剤

(57) 【要約】

【構成】 次のアミノ酸配列で表されるアミノ酸配列を含むペプチド。Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr ヒトまたはウシテクトフェリンをプロテアーゼで分解して、上記ペプチドを採取するか、あるいはペプチド合成により製造する方法。

【効果】 免疫賦活性あるいはサイトメガロウィルス感染防御活性を示し、医薬等として用いられる。

1

2

【特許請求の範囲】

ノ酸配列を含むペプチド。

【請求項 1】 次のアミノ酸配列〔I〕で表されるアミ

Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr
-Lys

〔I〕

【請求項 2】 アミノ酸配列〔I〕のN末端のアミノ酸残基が 1～3 残基欠失したものである請求項 1 記載のペプチド。

【請求項 3】 次のアミノ酸配列〔II〕で表されるアミノ酸配列を含むペプチド。

【化 1】

Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr
-Lys
-Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val
-Ser-Cys-Ile-Lys-Arg-Asp-Ser-Pro-Ile-Gln-Cys-Ile-Gln-Ala-Ile-Ala-Glu

〔II〕

但し S-S 結合は還元状態の SH 基となってもよい。

【請求項 4】 次のアミノ酸配列〔III〕で表されるアミノ酸配列を含むペプチド。

Ala-Pro-Arg-Lys-Asn-Val-Arg-Trp-Cys-Thr-Ile-Ser-Gln-Pro-Asp-Ser-Phe-Lys

〔III〕

【請求項 5】 次のアミノ酸配列〔IV〕で表されるアミノ酸配列を含むペプチド。

【化 2】

Ala-Pro-Arg-Lys-Asn-Val-Arg-Trp-Cys-Thr-Ile-Ser-Gln-Pro-Asp-Ser-Phe-Lys
-Cys-Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Gly-Ala-Pro-Ser-Ile-Thr
-Cys-Val-Arg-Arg-Ala-Phe-Ala-Leu-Glu-Cys-Ile-Arg-Ala-Ile-Ala-Glu

〔IV〕

但し S-S 結合は還元状態の SH 基となってもよい。

【請求項 6】 請求項 1～5 記載のペプチドまたはその薬理学的に許容される塩を有効成分とする免疫賦活剤

【請求項 7】 請求項 1～5 記載のペプチドまたはその薬理学的に許容される塩を有効成分とするサイトメガロウイルス感染防御剤。

【請求項 8】 ヒトラクトフェリンを、プロテアーゼにより酵素分解し、酵素分解物から請求項 1～3 記載のい

【請求項 9】 ウシラクトフェリンを、プロテアーゼにより酵素分解し、酵素分解物から請求項 4～5 記載のペプチドを採取することを特徴とするペプチドの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は新規ペプチドおよびこのペプチドを有効成分とする免疫賦活剤に関する。

【0002】

【従来の技術】ラクトフェリン (LF) は、乳中に存在する鉄結合性の蛋白質として知られている。乳以外の種々の分泌液中にも存在し、関節腔内や血清などにも存在し、鉄と結合して溶液中の鉄イオンを奪うことで抗菌作用を示す。またラクトフェリンは抗菌活性の他に、ウイルスに対する結合性や老化防止効果を有するなどの活性が知られている。またラクトフェリンのアミノ酸配列の一部分に、鉄結合性と異なる抗菌活性があることが確認されている (特開平 5-78392、特開平 5-148296)。このようにラクトフェリンには種々の活性が存在している。ラクトフェリンは、通常牛乳から大量に調製する方法が開発されている。たとえば特開昭 63-255300 号公報にはラクトフェリンに対して親和性を有する架橋型ポリサッカライドの硫酸エステルを用いて乳からラクトフェリンを回収する方法が開示されている。このようにして得たラクトフェリンを用いることによって幾つかの新しい生理作用や詳細な構造が判明している。このようなラクトフェリンの構造と生理活性については島崎らが総説で説明している (島崎敬一他、バイ

3

オサイエンスとインダストリー, Vol. 51, 25-27, 1993)。
また特開平5-178759号公報にはラクトフェリンが末梢血中に好中球の食能を活性化し、免疫を向上させることが記載されている。しかしラクトフェリン由来のペプチドがリンパ球のマイトーゲン活性を誘導し免疫機能を賦活化することは知られていない。

【0003】本発明者らはラクトフェリンを酵素分解処理に付すことにより、ラクトフェリンの構造中に存在するペプチドの生理活性を検討してきた。ラクトフェリンの構造中に存在する特定のペプチドが、抗HIV活性や、抗HTLVに対して作用し感染を抑制することを確認し、特願平5-240284号、特願平6-15851号として特許出願を行った。さらにラクトフェリンの酵素分解物について詳細に検討を行った結果、ラクトフェリンのアミノ酸配列中に存在する特定のペプチド構造を含むペプチドが強いリンパ球のマイトーゲン活性を有していることを見出しその作用について検討を行った結果、本発明を完成するに至った。

【0004】

LFおよびLF酵素分解物のマイトーゲン活性

| サンプル | 濃度 (μg/ml) | S. I. 値 | | | | |
|------|------------|---------|-------|-------|-------|-------|
| | | 未分解 | 酵素分解物 | | | |
| | | | ペプチドA | ペプチドB | ペプチドC | ペプチドD |
| ヒトLF | 1 | 1.19 | 1.05 | 1.11 | 1.13 | 1.10 |
| | 10 | 1.30 | 1.10 | 1.27 | 1.25 | 1.13 |
| | 100 | 1.36 | 1.21 | 1.29 | 1.32 | 1.19 |
| ウシLF | 1 | 1.10 | 1.07 | 1.04 | 1.05 | 1.02 |
| | 10 | 1.27 | 1.19 | 1.21 | 1.22 | 1.20 |
| | 100 | 1.31 | 1.26 | 1.31 | 1.30 | 1.23 |
| ヤギLF | 1 | 1.12 | 1.06 | 1.05 | 1.02 | 1.03 |
| | 10 | 1.21 | 1.10 | 1.09 | 1.16 | 1.20 |
| | 100 | 1.25 | 1.19 | 1.23 | 1.26 | 1.20 |

【0006】

【表2】

LF酵素分解物のin vivoにおける腫瘍増殖抑制作用

| サンプル | 投与量 (g/体重kg) | 生存率 (%) | | | | |
|------|--------------|---------|-------|-------|-------|-------|
| | | 未分解 | 酵素分解物 | | | |
| | | | ペプチドA | ペプチドB | ペプチドC | ペプチドD |
| ヒトLF | 0.005 | 80 | 30 | 60 | 60 | 30 |
| | 0.010 | 100 | 60 | 70 | 60 | 70 |
| | 0.050 | 100 | 60 | 80 | 70 | 70 |
| ウシLF | 0.005 | 80 | 50 | 60 | 50 | 30 |
| | 0.010 | 100 | 60 | 60 | 80 | 60 |
| | 0.050 | 100 | 80 | 70 | 90 | 70 |
| ヤギLF | 0.005 | 60 | 20 | 40 | 50 | 30 |
| | 0.010 | 80 | 60 | 80 | 50 | 60 |
| | 0.050 | 100 | 70 | 80 | 90 | 60 |

【0007】このようにラクトフェリンの酵素分解物には強い免疫賦活作用とこれによると推測される強い抗腫瘍効果が存在することが確認できた。本発明者らは、さらにラクトフェリンのアミノ酸配列中に存在するペプチド

4

【本発明が解決しようとする課題】本発明者らは、ラクトフェリンの生理活性について検討を行った結果、ラクトフェリンの酵素分解物中に強いマイトーゲン活性と、強い抗腫瘍活性を有することを見いだした。ラクトフェリンをペプシン、トリプシン、キモトリプシン、パバイン (いずれもシグマ社製) を用いてラクトフェリン/酵素=100/1で37℃で1時間インキュベートした。インキュベート後ペプシン分解物は反応液を中性に戻し、その他は80℃で5分間加熱することで反応を停止させた。生じた沈殿を遠心分離により除去し、上清を凍結乾燥することでLFの酵素分解物の粉末を得た。この酵素分解物を試料として以下の実施例に記載した方法でリンパ球の幼若化および抗腫瘍活性を測定したところ、これまで報告のない強い活性を有することを見いだした。この活性測定結果を下記の表1及び表2に示した。

【0005】

【表1】

ド構造に関して検討を行った結果、マイトーゲン活性を発揮するに必須の構造を初めて解明した。本発明はこのようなラクトフェリンのアミノ酸配列中に存在し、マイトーゲン活性を有する新規ペプチドを提供すること

5

を課題とする。またこのようなペプチドを有効成分とする、免疫活性剤を提供することを課題とする。さらにはこのペプチドを有効成分とするサイトメガロウイルス感染の防御剤を提供することを課題とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明のマイトोजェン

Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr
-Lys

【0010】ヒトラクトフェリンの全アミノ酸配列はすでに決定されている (M. W. Rey, et al., Nucleic Acid Res., Vol. 18, 5288, 1990)。このペプチドはヒトラクトフェリンのアミノ酸配列の 1-19 番目のアミノ酸配列に相当しており、この配列を含むペプチドは、本発明に包含されるものである。以下、ラクトフェリン由来のペプチドのアミノ酸配列はこの文献に従い、Gly を 1 番目と

6

活性を有するペプチドはペプチド配列中に、次のアミノ酸配列を有することが必要である。即ちヒトラクトフェリン由来のペプチドの場合、次の配列 [I] を含むペプチドである。

【0009】

[I]

して、アミノ酸配列の番号で記載する。このペプチドは N 末端から 1-3 残基欠失したものであっても良い。このアミノ酸配列を含むペプチドの例として次の配列 [I] のペプチドが例示出来る。

【0011】

【化 3】

Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Val-Gln-Trp-Cys-Ala-Val-Ser-Gln-Pro-Glu-Ala-Thr-Lys
hr-Lys-Cys-Phe-Gln-Trp-Gln-Arg-Asn-Met-Arg-Lys-Val-Arg-Gly-Pro-Pro-Val
-Ser-Cys-Ile-Lys-Arg-Asp-Ser-Pro-Ile-Gln-Cys-Ile-Gln-Ala-Ile-Ala-Glu

[II]

【0012】このペプチドはヒトラクトフェリンの 1-52 番目に相当している。またこのペプチドの S-S 結合は還元状態の SH 基となってもよい。配列 [I] および配列 [I I] は、N 末端アミノ酸 1-3 残基が欠失していてもよい。即ちヒトラクトフェリン 2-19 番目、3-19 番目、4-19 番目、またはヒトラクトフ

ェリン 2-52 番目、3-52 番目、4-52 番目のアミノ酸配列に相当するものであってもよい。

【0013】ウシラクトフェリン由来のペプチドの場合、次の配列 [III] を含むペプチドである。

【0014】

Ala-Pro-Arg-Lys-Asn-Val-Arg-Trp-Cys-Thr-Ile-Ser-Gln-Pro-Asp-Ser-Phe-Lys

[III]

【0015】ウシラクトフェリンの全アミノ酸配列はヒトラクトフェリンと同様にすでに決定されている (P. E. Mead, et al., Nucleic Acid Res., Vol. 18, 7167, 1990)。このペプチドはウシラクトフェリンのアミノ酸配列の 1-18 番目のアミノ酸配列に相当しており、この配列を含むペプチドは、本発明に包含されるものである。以下

ウシラクトフェリン由来のペプチドのアミノ酸配列はこの文献に従い、Ala を 1 番目として、アミノ酸配列の番号で記載する。このアミノ酸配列を含むペプチドの例として次の配列 [IV] のペプチドが例示出来る。

【0016】

【化 4】

Ala-Pro-Arg-Lys-Asn-Val-Arg-Trp-Cys-Thr-Ile-Ser-Gln-Pro-Asp-Ser-Phe-Lys
ys-Cys-Arg-Arg-Trp-Gln-Trp-Arg-Met-Lys-Lys-Leu-Gly-Ala-Pro-Ser-Ile-Thr
-Cys-Val-Arg-Arg-Ala-Phe-Ala-Leu-Glu-Cys-Ile-Arg-Ala-Ile-Ala-Glu

[IV]

【0017】このペプチドはウシラクトフェリンの 1-51 番目に相当している。またこのペプチドの S-S 結合

は還元状態の SH 基となってもよい。配列 [I I] および配列 [I V] は、N 末端アミノ酸 1-3 残基

7

が欠失していてもよい。即ちウシラクトフェリン2-18番目、3-18番目、4-18番目またはウシラクトフェリン2-51番目、3-51番目、4-51番目のアミノ酸配列に相当するものであっても良い。これらのペプチドはもとの蛋白質と比べて、低分子であり投与にあたって抗原性は低くなっている。

【0018】本発明のペプチドを調製するには、通常のペプチド合成法が採用できる。ペプチド合成方法としては固相合成方法が一般的であるが、この固相合成方法は「泉谷他著、ペプチド合成の基礎と実験（1985年丸善刊）194～233頁」などに開示された方法を挙げることができる。またこれ以外の方法であっても良い。また、ヒトラクトフェリンまたはウシラクトフェリンをプロテアーゼによって酵素分解し、クロマトグラフィーにより分取することもできる。また酵素分解に付するためのラクトフェリンは、ヒトやウシの乳から容易に回収することができる。例えば上述した特開昭63-255300号公報に開示されたラクトフェリンに対して親和性を有する架橋型ポリサッカライドの硫酸エステルを用いて、乳から回収することができる。ラクトフェリンの酵素分解に用いる酵素としては、通常蛋白質の酵素分解に用いる酵素であれば、いずれも使用可能である。このような酵素としてはペプシン、トリプシン、キモトリプシン、パパインなどを例示することができる。またこれ以外の酵素であっても使用することができる。このようにして得られた酵素分解物から常法によりクロマト処理することによってこれらのペプチドを採取することができる。また、通常のペプチド製造法に従って製造してもよい。

【0019】本発明のペプチドはリンパ球の幼若化を誘導し、抗ウイルス作用特にサイトメガロウイルスに対して感染防御効果を示す。本発明のペプチドは単独で投与することができるし、または、安定剤、賦形剤などの製剤化に用いる添加剤を使用して製剤化することもできる。本発明のペプチドは、食品や家畜飼料に添加して投与することができるし、医薬品、化粧品などの用途に使用することもできる。医薬品として用いる場合には経口、注射、座剤などの投与形態で用いることができ、通常成人1日当たり0.1～5g程度を投与することで、免疫賦活作用や、ウイルス感染防御効果を期待できるものである。また本発明ペプチドは、経口投与においては毒性を示さないし、また経静脈投与においても、物理的に投与可能最大投与において死亡動物が出現しない安全な物質である。

8

【0020】以下に実施例を示しさらに本発明を詳細に説明する。

【実施例1】

ラクトフェリン（以下LFと記す）の酵素分解物の調製とマイトージェン活性ペプチドの単離

特開昭63-255300号公報に記載の方法で牛乳から調製したLFを原料としてペプシン（シグマ社製）酵素分解処理を行った。LF/酵素=100/1の比率で、37℃1時間インキュベートした。インキュベート後ペプシン分解物は反応液を中性に戻し、その他は80℃で5分間加熱することで反応を停止させた。生じた沈殿を遠心分離により除去し、上清を凍結乾燥してLFの酵素分解物の粉末を得た。この分解組成物をTSKゲルG300SWカラム（21.5mm×300mm：東ソー製）2本を直列につないだカラムを装着したHPLCに付し、分離を行った。溶出は0.015M NaClを含む1mMリン酸緩衝液（pH7.4）を溶出液とし、214nmの吸収を測定した。このゲル濾過パターンを図1に示した。

【0021】分離した各フラクションのリンパ球幼若化活性を以下の方法により測定した。C3H/HeNマウス脾臓細胞を採取し洗浄した後、牛胎児血清10%を含むRPMI1640培地に浮遊させた。脾臓細胞を 5×10^5 /ウエルになるよう96穴マイクロプレートに分注し、これに試料を最終濃度がそれぞれ $1 \mu\text{g/ml}$ 、 $10 \mu\text{g/ml}$ 、 $100 \mu\text{g/ml}$ となるよう添加した。対照ウエルにはコンカナバリンA（最終濃度 $1 \mu\text{g/ml}$ ）、リポポリサッカライド（最終濃度 $100 \mu\text{g/ml}$ ）を加え37℃48時間5%CO₂条件下で培養した。培養後3-（4，5-ジメチル-2-チアゾリル）2，5-ジフェニル-2Hテトラゾリウムブロマイド（以下MTTと略記）液 $10 \mu\text{l}$ を添加し、更に3時間培養後、生じたMTTフォルマザンをELISAリーダーを用い562-595nmで吸光度を測定した（以上の方法はMed. Immunol, 12, 411 (1986)に開示された方法に準じた）。結果は10ウエルの平均値としマイトージェン活性比（S. I.）は、次の式に基づいて計算した。

【0022】 $S. I. = (\text{試料ウエルの平均吸光度}) / (\text{対照ウエルの平均吸光度}) \times 100$

【0023】各フラクションのS. I. 値を表3に示した。

【表3】

ウシLFペプシン分解物をゲル濾過することにより得られた画分のS. I. 値

| 画分 ^{a)} | S. I. |
|------------------|-------|
| 1 | 0.78 |
| 2 | 0.86 |
| 3 | 0.35 |
| 4 | 0.43 |
| 5 | 0.32 |
| 6 | 0.87 |
| 7 | 1.36 |
| 8 | 0.78 |
| 9 | 0.31 |
| 10 | 0.31 |
| 11 | 0.28 |
| 12 | 0.21 |
| 13 | 0.27 |
| 14 | 0.30 |

^{a)} ペプチド濃度は、10 μ g/ml

【0024】各フラクションの内、特に活性の高かったフラクション7について再度HPLCによりその溶出位置を測定し、以下に示した合成ペプチドと比較した結果、このフラクションの溶出時間はウシLF1-18と一致した。またこのフラクションのアミノ酸配列を分析したところウシLF1-18の配列を有することが確認できた。

【0025】

【実施例2】

ヒトLF酵素分解物の調製とマイトージェン活性ペプチドの単離

実施例1と同様に操作を行い、ヒトLFの酵素分解物を調製し、この酵素分解物中のS. I. 活性を示すペプチドを、HPLCによる保持時間およびアミノ酸配列により同定した。その結果、S. I. 活性を示すペプチドはヒトLF1-19であることを確認した。

【0026】

【実施例3】

活性ペプチドの化学合成

実施例1、2で確認したペプチドおよびそのアミノ酸配列を含むペプチドの合成を行った。本実施例ではヒトLF1-19、ヒトLF1-52、ウシLF1-18、ウシLF1-51の合成例を示した。本明細書に記載したこれ以外のペプチドの合成も、本実施例に準じて合成した。

(1) ヒトLF1-19の合成

ペプチドシンセサイザー431A (ABI社) により、パラヒドロキシメチルフェノキシメチルポリスチレン (HMP) 樹脂を用い、9-フルオレニルメチルオキカルボニル (Fmoc) 基をアミノ末端の保護基として0.25mmolスケールで直鎖保護ペプチドを合成した。得られたHMP樹脂結合保護ペプチド1455mgをフェノール、1, 2-エタンジチオール、チオアニソール存在下、トリフルオロ酢酸 (TFA) によりペプチドのHMP樹脂からの切り離しと保護基の除去を同時に行った。減圧濃縮によりTFAを除去した後、エチルエーテルで粗ペプチドを結晶化させ、これを5%酢酸に溶

解し凍結乾燥を行った。得られた直鎖粗ペプチド500mgは、HPLC [カラム: オクタデシル4PW (21.5×150mm, (東ソー社), 溶出: 0.1% TFAを含む水-アセトニトリルにてグラジエント溶出) により精製し直鎖精製ペプチド410mgを得た。得られた精製ペプチドの純度は、HPLCによる分析の結果93%であった。

【0027】 (2) ヒトLF1-52 [²⁰Cys(Acm), ³¹Cys(Acm)]、ヒトLF1-52および [¹⁰CysSH, ²⁰Cys(Acm), ³¹Cys(Acm), ⁴⁶CysSH] ヒトLF1-52の合成
ペプチドシンセサイザー431A (ABI社) により、パラヒドロキシメチルフェノキシメチルポリスチレン (HMP) 樹脂を用い、9-フルオレニルメチルオキカルボニル (Fmoc) 基をアミノ末端の保護基とし、²⁰Cys および³¹Cys のSH基をアセトアミドメチル (Acm) 基で保護して0.25mmolスケールで直鎖保護ペプチドを合成した。得られたHMP樹脂結合保護ペプチド2337mgをフェノール、1, 2-エタンジチオール、チオアニソール存在下、トリフルオロ酢酸 (TFA) によりペプチドのHMP樹脂からの切り離しと保護基の除去を同時に行った。減圧濃縮によりTFAを除去した後、エチルエーテルで粗ペプチドを結晶化させ、これを5%酢酸に溶解し凍結乾燥を行った。得られた直鎖粗ペプチド970mgは、HPLC (カラム: オクタデシル4PW (21.5×150mm, 東ソー社), 溶出: 0.1% TFAを含む水-アセトニトリルにてグラジエント溶出) により精製し直鎖精製ペプチド [¹⁰CysSH, ²⁰Cys(Acm), ³¹Cys(Acm), ⁴⁶CysSH] ヒトLF (1-52) 607mgを得た。得られた精製ペプチドの純度は、HPLCによる分析の結果96%であった。このペプチドをフェリシアン化カリウム存在下空気酸化により¹⁰Cys, ⁴⁶Cys にS-S結合を形成させさらにHPLCにて精製することで、純度90%の [²⁰Cys(Acm), ³¹Cys(Acm)] ヒトLF (1-52) 450mgを得た。さらにこのペプチドをヨウ素処理しAcm基の除去とS-S結合の形成を同時に行い、HPLCで精製することでヒトLF (1-52) 120mgを得た。HPLCによる分

11

析の結果このペプチドの純度は89%であった。

【0028】(3) ウシLF1-18の合成

実施例2と同様の方法でウシLF1-18のアミノ酸配列を持ったペプチドを合成し、純度98%の鎖状ペプチド365mgを得た

【0029】(4) ウシLF(1-51)、 $[^{19}\text{Cys}(\text{Ac})$ 、 $^{36}\text{Cys}(\text{Ac})$] ウシLF(1-51)および $[-^2\text{CysS}$ 、 $^{19}\text{Cys}(\text{Ac})$ 、 $^{36}\text{Cys}(\text{Ac})$ 、 $^{45}\text{CysSH}$] ウシLF(1-51)の合成

実施例3と同様の方法で合成を行い、純度88%のウシLF(1-51)を576mg、純度90%の $[^{19}\text{Cys}(\text{Ac})$ 、 $^{36}\text{Cys}(\text{Ac})]$ ウシLF(1-51)を390mg

12

g、純度82%の $[^{9}\text{CysSH}$ 、 $^{19}\text{Cys}(\text{Ac})$ 、 $^{36}\text{Cys}(\text{Ac})$ 、 $^{45}\text{CysSH}]$ ウシLF(1-51)を得た。

【0030】

【実施例4】

合成ペプチドのリンパ球幼若化活性の測定

実施例3で得られた合成ペプチドのリンパ球幼若化作用を測定した。測定は実施例1に示した方法に従った。測定結果を下記の表4に示した。各合成ペプチドはいずれも強いS. I. 活性を有していた。

【0031】

【表4】

合成ペプチドのマイトーゼン活性

| サンプル ^{*1} | S-S結合 | S. I. |
|--------------------|---|-------|
| ヒトLF | | 1.30 |
| ヒトLF(1-19) | | 1.26 |
| ヒトLF(1-52) | ^{10}Cys - ^{46}Cys , ^{20}Cys - ^{37}Cys | 1.35 |
| ヒトLF(1-52) | ^{10}Cys - ^{46}Cys , | 1.33 |
| ヒトLF(1-52) | | 1.32 |
| ヒトLF(4-19) | | 1.28 |
| ウシLF | | 1.27 |
| ウシLF(1-18) | | 1.26 |
| ウシLF(1-51) | ^9Cys - ^{45}Cys , ^{19}Cys - ^{36}Cys | 1.30 |
| ウシLF(1-51) | ^9Cys - ^{45}Cys , | 1.31 |
| ウシLF(1-51) | | 1.29 |
| ウシLF(4-18) | | 1.25 |

^{*1} ペプチド濃度は、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$

【0032】

【実施例5】

合成ペプチドの抗腫瘍効果の測定

実施例3で得られた合成ペプチドの免疫賦活効果を確認するため、腹水型腫瘍の増殖抑制効果を指標として実験を行い、免疫マーカーの変化を観察した。BALB/c雄マウス(1群10匹)に10⁵~10⁶個の腹水型腫瘍細胞(Meth A 細胞)を腹腔内に移植した。腫瘍移植当日より、隔日に5回にわたり合成ペプチドを腹腔内に投与した。またポジティブコントロールとしてムラミルジペプチド(MDP)を3mg/kg同様に投与し、さらにネガティブコントロールにはカラギーナンを同様に

5に示した。サンプルについても0.005g/体重kg以上の投与量で腫瘍増殖抑制効果が認められ、特に合成ペプチド投与群では0.05g/体重kgの投与ではマウスの死亡は全く認められなかった。またペプチド投与動物のNK細胞が活性化されていることが確認された。NK細胞活性化の測定は、マウスの脾臓細胞をエフェクター細胞として、標的細胞に ^{51}Cr をラベルした腫瘍細胞(YAC-1)を用い、100:1の割合で混合し、遊離した ^{51}Cr の量からNK活性値を測定した。本発明物質投与動物のNK活性値は、コントロールと比べて有意に高値を示していた。

【0033】

【表5】

ペプチドの *in vivo* における腫瘍増殖抑制作用

| サンプル | 投与量 (g/体重kg) | 生存率 (%) |
|-------------|--------------|---------|
| ネオプラコントロール | — | 100 |
| ネオプラコントロール | — | 0 |
| ヒトLF (1-19) | 0.005 | 30 |
| | 0.010 | 60 |
| | 0.050 | 100 |
| ヒトLF (1-52) | 0.005 | 70 |
| | 0.010 | 100 |
| | 0.050 | 100 |
| ウシLF (1-18) | 0.005 | 50 |
| | 0.010 | 80 |
| | 0.050 | 100 |
| ウシLF (1-51) | 0.005 | 80 |
| | 0.010 | 90 |
| | 0.050 | 100 |

【0034】

【実施例6】

合成ペプチドによるサイトメガロウイルス感染防御効果
ヒト及びウシLFの各種合成ペプチドを調製し、このこのペプチドのサイトメガロウイルス感染防御効果を確認した。実験動物として、SPF-BALB/c A雄、4週齢を1群5匹として用いた。このマウスに、マウスサイトメガロウイルス (MCMV) Smith株のマウス唾液腺を10回以上通過したものを感染させて、その延

命率を求めて判定を行った。ウイルスの感染は 1×10^6 PFU/マウスの濃度で腹腔内に接種して行い、感染と同時に各ペプチドのPBS溶液を腹腔内に0.25、0.125、0.025、0.005 g/kg (体重) で投与した。また生存動物は解剖を行い、脾臓を摘出し、脾臓細胞のNK細胞活性を測定した。結果を表6に示した。

【0035】

【表6】

ペプチドのin vivoにおけるウイルス感染抑制作用

| サンプル | 投与量 (g/体重kg) | 生存率(%) |
|--------------|--------------|--------|
| ヒトLF (1-19) | 0.005 | 60 |
| | 0.025 | 80 |
| | 0.125 | 80 |
| | 0.25 | 100 |
| ヒトLF (1-52) | 0.005 | — |
| | 0.025 | — |
| | 0.125 | 100 |
| | 0.25 | — |
| ヒトLF (2-19) | 0.005 | 60 |
| | 0.025 | 20 |
| | 0.125 | 80 |
| | 0.25 | 100 |
| ヒトLF (1-40) | 0.005 | 20 |
| | 0.025 | 40 |
| | 0.125 | 100 |
| | 0.25 | 100 |
| ヒトLF (18-40) | 0.125 | 60 |
| | 0.25 | 0 |
| ヒトLF (19-31) | 0.125 | 20 |
| | 0.25 | 80 |
| ウシLF (1-18) | 0.005 | 60 |
| | 0.025 | 80 |
| | 0.125 | 100 |
| | 0.25 | 100 |
| ウシLF (1-51) | 0.005 | — |
| | 0.025 | — |
| | 0.125 | 100 |
| | 0.25 | — |
| ウシLF (4-18) | 0.125 | 60 |
| | 0.25 | 100 |
| ウシLF (17-41) | 0.125 | 60 |
| | 0.25 | 0 |
| ウシLF (20-39) | 0.125 | 100 |
| | 0.25 | 60 |
| ウシLF (38-53) | 0.125 | 20 |
| | 0.25 | 0 |

【0036】本発明のペプチドはヒトまたはウシLFのN末端側に活性が存在することが確認できた。またこの活性はN末端から3残基まで削除しても、影響がないことが確認できた。さらに本発明ペプチドを投与した動物はいずれもNK細胞活性が上昇していた。この活性もサイトメガロウイルスの感染防御活性と一致していた。

【0037】

【実施例7】

本実施例は、本発明ペプチドを製剤化した例を示す。

(1) 錠剤

乳糖170g、馬鈴薯澱粉5g、実施例3で合成したウシLF1-18 20g、ステアリン酸タルク5gを混合し、常法により打錠し、ペプチド100mgを含有する1gの錠剤を200個製造した。

(2) 注射剤

100ml中にマンニトール5g、実施例3で合成した

ヒトLF1-19 100mg、ヒト血清アルブミン100mg、カプリル酸ナトリウム2mgを含む水溶液を無菌的に調製し、1mlずつバイアルに分注し、凍結乾燥し密封した。

【0038】

【発明の効果】本発明の実施により、新規ペプチド、その製造法及びこのペプチドを有効成分とする免疫賦活剤、サイトメガロウイルス感染防御剤が提供される。

【0039】

【配列表】

配列番号:1

配列の長さ:19

配列の型:アミノ酸

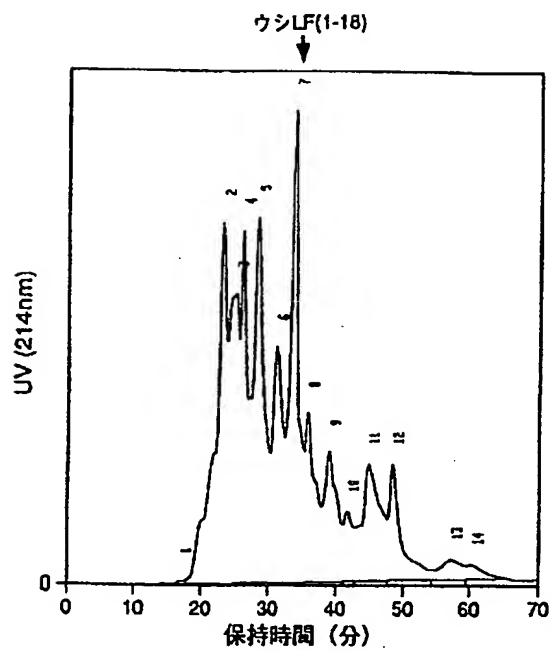
トポロジー:直鎖状

配列の種類:ペプチド

フラグメント型:N末端部フラグメント

| | |
|--|----------------------------------|
| <p>17</p> <p>起源：ヒトラクトフェリン</p> | <p>18</p> <p>配列の特徴</p> |
| <p>配列：</p> | |
| <p>Gly Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala Val Ser Gln Pro Glu</p> <p>1 5 10</p> <p>Ala Thr Lys</p> | |
| <p>【0040】配列番号：2</p> | <p>配列の種類：ペプチド</p> |
| <p>配列の長さ：52</p> | <p>フラグメント型：N末端部フラグメント</p> |
| <p>配列の型：アミノ酸</p> | <p>起源：ヒトラクトフェリン</p> |
| <p>トポロジー：直鎖状</p> | <p>配列の特徴</p> |
| <p>配列：</p> | |
| <p>Gly Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala Val Ser Gln Pro Glu</p> <p>1 5 10 15</p> <p>Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly</p> <p>20 25 30</p> <p>Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp Ser Pro Ile Gln Cys Ile Gln</p> <p>35 40 45</p> <p>Ala Ile Ala Glu</p> <p>50</p> | |
| <p>【0041】配列番号：3</p> | <p>配列の種類：ペプチド</p> |
| <p>配列の長さ：18</p> | <p>フラグメント型：N末端部フラグメント</p> |
| <p>配列の型：アミノ酸</p> | <p>起源：ウシラクトフェリン</p> |
| <p>トポロジー：直鎖状</p> | <p>配列の特徴</p> |
| <p>配列：</p> | |
| <p>Ala Pro Arg Lys Asn Val Arg Trp Cys Thr Ile Ser Gln Pro Asp Ser</p> <p>1 5 10 15</p> <p>Phe Lys</p> | |
| <p>【0042】配列番号：4</p> | <p>配列の種類：ペプチド</p> |
| <p>配列の長さ：51</p> | <p>フラグメント型：N末端部フラグメント</p> |
| <p>配列の型：アミノ酸</p> | <p>起源：ウシラクトフェリン</p> |
| <p>トポロジー：直鎖状</p> | <p>配列の特徴</p> |
| <p>配列：</p> | |
| <p>Ala Pro Arg Lys Asn Val Arg Trp Cys Thr Ile Ser Gln Pro Asp Ser</p> <p>1 5 10 15</p> <p>Phe Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro</p> <p>20 25 30</p> <p>Ser Ile Thr Cys Val Arg Arg Ala Phe Ala Leu Glu Cys Ile Arg Ala</p> <p>35 40 45</p> <p>Ile Ala Glu</p> <p>50</p> | |
| <p>【図面の簡単な説明】</p> | <p>物のHPLCパターンを示す。図中の↓印のピークに本</p> |
| <p>【図1】ウシラクトフェリンのペプシンによる酵素分解</p> | <p>発明のペプチドが存在する。</p> |

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

C 0 7 K 7/08

C 1 2 P 21/06

識別記号

Z N A

庁内整理番号

8318-4H

9282-4B

F I

技術表示箇所

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)